

⑭ 公開特許公報 (A) 平3-157400

⑮ Int. Cl. 5

C 07 K 15/12
A 61 K 37/02
C 07 K 3/20

識別記号

ADU

庁内整理番号

8619-4H
8615-4C

⑯ 公開 平成3年(1991)7月5日

※

審査請求 未請求 請求項の数 23 (全18頁)

⑭ 発明の名称 ヒトインターフェロン- β 2/インターロイキン-6受容体

⑮ 特願 平2-144235

⑯ 出願 平2(1990)6月1日

優先権主張 ⑰ 1989年6月1日 ⑲ イスラエル(IL) ⑳ 090488

⑭ 発明者 ダニエラ ノビツク イスラエル国レホボト、ハナシ ハリション ストリート
40⑭ 発明者 ルイーズ チエン イスラエル国ラマット アビブ、タゴール ストリート
52⑭ 出願人 イエダ リサーチ ア
ンド デベロップメン
ト カンパニー リミ
テッド イスラエス国レホボト ピー オー ポツクス 95⑭ 代理人 弁理士 浅村 眞 外3名
最終頁に続く

明細書の添付(内容に変更なし)

明細書

1. 発明の名称

ヒトインターフェロン- β 2/インターロイキン-6受容体

2. 特許請求の範囲

(1) ヒト天然インターフェロン- β 2/インターロイキン-6受容体(以下IFN- β 2/IL-6-Rという)、その可溶性細胞外フラグメントならびにその塩、官能性誘導体、前駆体および活性分画、およびIFN- β 2/IL-6と特異的に結合できるこれらの任意の混合物。

(2) 実質的に精製された形の請求項(1)記載のヒト天然IFN- β 2/IL-6-R。

(3) 実質的に精製された形の請求項(1)記載のヒトIFN- β 2/IL-6-R可溶性細胞外フラグメント。

(4) 実質的に精製された蛋白質をSDS-PAGEにより非還元条件下に分析すると分子量約50Kを有する請求項(3)記載のヒトIFN- β 2/IL-6-R可溶性細胞外フラグメント。

(5) 逆相高速液体クロマトグラフィー

(HPLC)で単一のピークとして移動する請求項(3)または(4)のいずれかに記載のヒトIFN- β 2/IL-6-R可溶性細胞外フラグメント。

(6) 以下のN-末端アミノ酸配列:

Leu-Ala-Pro-Arg-Arg-Cys-Pro-Ala-Glu-Glu-Val-Ala-Arg-Gly-Val-Leu-Thr-Ser-Leu-Pro-Gly-Ala-Ser-Val-Thr-Leu-Thr-Cys-Pro-Gly-

を含有する請求項(1)、(3)、(4)または(5)のいずれかに記載のヒトIFN- β 2/IL-6-R可溶性細胞外フラグメント。

(7) 請求項(1)または(2)記載のヒト天然IFN- β 2/IL-6受容体を単離するにあたり、その受容体をもつヒト細胞、特に胎盤細胞を可溶化して懸濁液を得、その懸濁液を遠心分離し、上澄液を固定化IFN- β 2/IL-6カラムに適用し、結合した受容体蛋白質を各種pH条件により純度を高めた状態で溶出させる方法。

(8) 実質的に精製されたIFN- β 2/IL-6-R可溶性細胞外フラグメントを製造する方法

において、

- (1) ヒト尿の透析濃縮物から粗蛋白分画を回収し、
- (2) 工程(1)の粗蛋白分画を固定化 I FN- β 2/I L-6カラム上アフィニティーコロマトグラフィーに付し、
- (3) 工程(2)からの I FN- β 2/I L-6結合蛋白質の精製活性分画を逆相高速液体クロマトグラフィー(HPLC)に適用し、
- (4) 39%アセトニトリルで溶出し、非還元条件下 SDS-PAGEにより分子量約50Kを有し、逆相HPLCで単一のピークとして移動する実質的に精製された I FN- β 2/I L-6-R可溶性細胞外フラグメントを含有する分画を回収する方法。
- (5) 工程(4)の粗蛋白分画は工程(2)のアフィニティーコロマトグラフィーに先立ってイオン交換クロマトグラフィーに付す請求項(8)記載の方法。
- (6) 工程(5)のアフィニティーコロマトグラフ

フラグメントを製造する方法において、(1) 請求項(14)記載のトランスホーマント宿主細胞を適当な培地で培養し、ついで(2) I FN- β 2/I L-6-R可溶性細胞外フラグメントを単離する方法。

- (16) I FN- β 2/I L-6-Rおよび/またはその可溶性細胞外フラグメントを特異的に認識するその受容体および/またはフラグメントに対する抗体。
- (17) ポリクローナル抗体である請求項(16)記載の抗体。
- (18) モノクローナル抗体である請求項(16)記載の抗体。

(19) 活性成分として、ヒト天然 I FN- β 2/I L-6-Rまたはその可溶性細胞外フラグメント、それらの塩、官能性誘導体、前駆体もしくは活性分画、およびこれらの任意の混合物と、医薬的に許容される担体とからなる医薬組成物。

(20) 活性成分としてヒト I FN- β 2/I L-6-R可溶性細胞外フラグメントを含有する請求

イーは抗-I FN- β 2/I L-6-Rモノクーナル抗体のカラム上で行う請求項(8)または(9)に記載の方法。

- (11) 組換え蛋白質またはそれと実質的に相同的組換え蛋白質である請求項(1)記載の I FN- β 2/I L-6-R可溶性細胞外フラグメント。
- (12) 請求項(1)、(3)～(6)もしくは(11)のいずれかに記載の I FN- β 2/I L-6-R可溶性細胞外フラグメント、またはそれと実質的に相同的の蛋白質をコードするヌクレオチド配列からなるDNA分子。
- (13) 請求項(12)記載のDNA分子からなり、トランスホーマント宿主細胞中で請求項(1)、(3)～(6)または(11)のいずれかに記載の I FN- β 2/I L-6-R可溶性細胞外フラグメントを発現できる複製可能な発現ビヒクル。
- (14) 請求項(13)記載の複製可能な発現ビヒクルでトランスホームされた原核細胞および真核細胞から選ばれる宿主細胞。
- (15) I FN- β 2/I L-6-R可溶性細胞外

項(19)記載の医薬組成物。

- (21) さらにヒト I FN- β 2/I L-6を含有する請求項(19)または(20)に記載の医薬組成物。
- (22) 乳癌の処置用の請求項(21)記載の医薬組成物。
- (23) I FN- β 2/I L-6の有用な効果たとえばその抗増殖活性の刺激および増強に使用するための I FN- β 2/I L-6-Rおよび/またはその可溶性細胞外フラグメント、それらの塩、官能性誘導体、前駆体もしくは活性分画、およびこれらの任意の混合物。

3. 発明の詳細な説明

発明の分野

本発明は、ヒトインターフェロン- β 2/インターロイキン-6受容体(以下、I FN- β 2/I L-6-Rという)、その可溶性細胞外フラグメント、その塩、官能性誘導体、前駆体、および活性分画に関する。本発明はまた、ヒト天然 I FN- β 2/I L-6-Rおよびその可溶性細胞外フラグメントの精製方法、その可溶性細胞外

フラグメントのクローニングおよびその組換えDNA技術による产生、ならびにそれに対するポリクローナルおよびモノクローナル抗体に関する。本発明はさらに、ヒト天然IFN- β 2/IL-6-Rもしくはその可溶性細胞外フラグメント、またはそれらの塩、官能性誘導体、前駆体および活性分画を含有する医薬組成物に関する。

発明の背景

現在ではインターロイキン-6と命名されているインターフェロン- β 2（以下、IFN- β 2/IL-6という）は、各種の細胞および組織の成長および分化を調節し、またウイルスおよび細菌感染やショックに対する反応の重要なメディエーターと考えられている多機能性サイトカインである。IFN- β 2/IL-6が関連する生物学的作用には、成熟Bリンパ球による免疫グロブリン分泌の刺激（BSF-2活性）、形質細胞腫およびハイブリドーマの成長刺激（HGF活性）、T細胞活性化、肝急性相蛋白質合成の刺激（HSF活性）、造血機能の刺激、細胞分化（DIF活

性）、腫瘍細胞成長の阻害（AP活性）ならびに他のINF様作用が含まれる。代表的なサイトカインとして、IFN- β 2/IL-6は多くの細胞種によって分泌され、他のインターロイキンおよびインターフェロンと多様に組合わさせて作用する。抗腫瘍活性の可能性が考えられる活性には、癌細胞の成長およびコロニー形成の阻害、悪性細胞のより正常な表現型への分化、正常造血機能の刺激、Tリンパ球活性化の刺激、B細胞による抗体分泌の刺激、補体合成の刺激、ならびにアンチプロテアーゼ合成の刺激がある。

ヒトIFN- β 2/IL-6受容体クローニングはすでに報告されている(Yamissakiら: Science, 241巻、825~828頁)。しかしながら、天然ヒトIFN- β 2/IL-6受容体およびその可溶性細胞外フラグメントはまだ単離されておらず、文献に記載はない。

発明の要約

IFN- β 2/IL-6-Rおよびその可溶性フラグメントは、マウス形質細胞腫細胞に対する

IFN- β 2/IL-6の刺激作用を強力に増強し、またヒト乳癌に対するヒトIFN- β 2/IL-6の成長阻害作用を著しく増強すること、すなわちIFN- β 2/IL-6の生物活性の增强に使用できることが見出された。すなわち、本発明は、IFN- β 2/IL-6に特異的に結合してIFN- β 2/IL-6の有益な生物学的作用の刺激および增强が可能な、ヒト天然インターフェロン- β 2/インターロイキン-6受容体（本明細書ではIFN- β 2/IL-6-Rと略称する）、その可溶性細胞外フラグメント、それらの塩、官能性誘導体、前駆体および活性分画を提供する。本発明は、蛋白性の不純物を含まない実質的に精製された形態の上記ヒト天然IFN- β 2/IL-6-R、およびその単離方法を指図するものである。

本発明はまた、蛋白性の不純物を含まない実質的に精製された形態の、逆相HPLCで单一のピークとして移動するヒトIFN- β 2/IL-6-R可溶性細胞外フラグメント、ならびにそのフ

ラグメントのヒト体液たとえば尿からの単離および精製方法に関する。

本発明はまた、ヒトIFN- β 2/IL-6-Rおよびその可溶性細胞外フラグメントに対するポリクローナルおよびモノクローナル抗体を指図する。

本発明はさらに、IFN- β 2/IL-6-R可溶性細胞外フラグメントまたはそれと実質的に相同の蛋白質をコードするDNAの製造、それを含有する発現ビヒクルおよびそれでトランスポンダされた宿主細胞の構築、ならびにこのトランスポンダント細胞を適当な培地中で培養することによるIFN- β 2/IL-6-R可溶性細胞外フラグメントまたはそれと実質的に相同の蛋白質を產生させる過程を包含するIFN- β 2/IL-6-R可溶性細胞外フラグメントの組換えDNA技術による製造に関する。

本発明のヒト天然IFN- β 2/IL-6-Rおよびその可溶性細胞外フラグメント、およびそれらの塩、官能性誘導体、前駆体、活性分画、な

らびにこれらの任意の混合物は、IFN- β 2/IL-6の有益な作用を増強するため、IFN- β 2/IL-6と配合して医薬組成物の活性成分として使用される。

図面の簡単な説明

第1図は、IFN- β 2/IL-6-R可溶性細胞外フラグメント分画の、固定化IFN- β 2/IL-6カラム上での部分精製後における、逆相HPLCカラム溶出パターンを示す。

第2図は、精製IFN- β 2/IL-6-R可溶性細胞外フラグメントの非還元条件下でのSDS-PAGE、ついで銀染色（レーン1および2）または電気プロッティング、 125 I- $\text{r IFN-}\beta$ 2/IL-6結合およびオートラジオグラフィーによる可視化（レーン3および4）による分析結果を示す。

第3図は、ヒト乳癌T47D細胞に対するIFN- β 2/IL-6-HGF活性の、IFN- β 2/IL-6-R可溶性細胞外フラグメントによる増強を示す。

本発明のIFN- β 2/IL-6-Rの可溶性細胞外フラグメントはヒト尿中に見出された。実質的に蛋白性不純物を含まないその実質的に精製された形態では、非還元条件下SDS-PAGEで分析すると分子量約50(40~60)Kを示し、逆相HPLCで单一のピークとして移動する。

この蛋白質はさらに、N-末端配列解析によって得られた以下の配列によって特徴づけられる。

Leu-Ala-Pro-Arg-Arg-Cys-Pro-Ala-Gln-Glu-Val-Ala-Arg-Gly-Val-Leu-Thr-Ser-
Leu-Pro-Gly-Asp-Ser-Val-Thr-Leu-Thr-Cys-Pro-Gly-

本発明は、上記配列からなるポリペプチド、ならびにIFN- β 2/IL-6-Rフラグメントの構造における1個もしくは2個以上のアミノ酸の欠失もしくは他のアミノ酸による置換または1個もしくは2個以上のアミノ酸の付加が行われたポリペプチドでIFN- β 2/IL-6-Rに特異的に結合する任意の他のポリペプチドを包含する。

本発明はまた、ヒト体液たとえば尿からの

発明の詳細な説明

各種ヒト細胞上のIFN- β 2/IL-6の受容体は、放射標識IFN- β 2/IL-6での架橋実験によって同定される。簡単に説明すれば、純粋なIFN- β 2/IL-6を既報の操作に従ってクロラミン-T法により(¹²⁵I)で標識し、その完全な生物学的活性は維持させる。このような標識IFN- β 2/IL-6を4°Cで各種ヒト細胞と反応させ、得られたIFN- β 2/IL-6受容体複合体を共有結合で架橋し、ついでドデシル硫酸ナトリウム(SDS)の存在下にポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)後オートラジオグラフィーによって解析する。同定後に、受容体を、受容体をもつヒト細胞の可溶化により懸濁液を得、その上澄液を固定化IFN- β 2/IL-6または抗-IFN- β 2/IL-6-Rモノクローナル抗体カラムに適用し、結合した受容体蛋白質を様々なpH条件で純度が高められた状態で溶出することからなる方法によって単離する。必要に応じて溶出分画をさらに精製してもよい。

IFN- β 2/IL-6-R可溶性細胞外フラグメントの単離およびその精製方法に関する。その好ましい一態様においては、本発明の実質的に精製された受容体フラグメントは、

- (a) 健常ドナーのヒト尿の透析濃縮物から粗蛋白分画を回収し、
- (b) 工程(a)の粗蛋白分画を固定化IFN- β 2/IL-6カラム上アフィニティー精製に付し、
- (c) 工程(b)からのIFN- β 2/IL-6結合蛋白質の上記アフィニティー精製活性分画を逆相HPLCに適用し、
- (d) 39%アセトニトリルで溶出し、非還元条件下SDS-PAGEにより分子量約50Kを有し、逆相HPLCで单一のピークとして移動する実質的に精製されたIFN- β 2/IL-6-R可溶性細胞外フラグメントを含有する分画を回収する方法によって製造される。

好ましい態様においては、工程(a)の粗蛋白分画はまず、たとえばカルボキシメチルSephadex

(CM-SephadexまたはCMS)カラム上、イオン交換クロマトグラフィーに付される。

他の好みの想様においては、工程(b)のアフィニティー精製は、IFN- β 2/IL-6-R可溶性フラグメントに対するモノクローナル抗体の固定化したカラム上で行われる。本発明はさらに遺伝子工学技術によるIFN- β 2/IL-6-R可溶性細胞外フラグメントの製造に関し、これらの技術に使用されるすべての手段を包含する。すなわち、本発明は、上述の受容体フラグメントまたはそれと実質的に相同的な蛋白質をコードするヌクレオチド配列からなるDNA分子に関する。これらのDNA分子はゲノムDNA、cDNA、合成DNA、およびそれらの組合せである。

IFN- β 2/IL-6-R可溶性細胞外フラグメントのクローニングは様々な方法で実施できる。このフラグメントをコードするDNAは合成されるか、それをコードする遺伝子をDNAライブラリーから単離されるか、または全IFN- β 2/IL-6受容体をコードする遺伝子をまず

得てついで公知の方法で切断する。ひとつ的方法では、IFN- β 2/IL-6受容体に対する特異的抗体(ポリクローナルまたはモノクローナル)を製造し、これを用いて免疫蛍光法またはウエスタンプロット法により受容体を産生する細胞を探索する。これらのIFN- β 2/IL-6受容体産生細胞からmRNAを抽出し、cDNAを形成させるのに適当な時間および条件下に逆転写酵素と接触させてcDNAに変換させる。cDNAをラムダgt11のような発現ベクター中にクローニ化し、抗体の使用によってスクリーニングする。ラムダgt11発現ベクターは、 β -ガラクトシダーゼ停止コドンの53塩基上流にある唯一のEcoRI部位に7kbまでの長さのDNAを挿入するために使用できる。したがって、外来性DNAはこの部位に挿入し、適当な条件下に融合蛋白質として発現させることができる。ラムダgt11発現ベクターは、抗体プローブを用いてスクリーニングされるcDNAライブラリーの構築にとくに有用である(Huynh, T. V. ら : David

Glover編、DNA Cloning Techniques :

A Practical Approach, IRL Press, Oxford (1984) 49~78頁)。

別の方法によれば、蛋白質のフラグメントのアミノ酸配列、たとえばN-末端アミノ酸配列から誘導された配列をもつ合成オリゴヌクレオチドまたは合成オリゴヌクレオチド混合物を製造し、IFN- β 2/IL-6受容体またはその可溶性フラグメントをコードするcDNAまたはそのゲノムDNAをクローニングするためのプローブとして使用する。適当なDNAプレバレーション、たとえばヒトゲノムDNAは制限酵素によって酵素的に切断するかまたはランダムに剪断し、フラグメントを適当な組換えベクター中に挿入して遺伝子ライブラリーを生成させる。このようなベクターをついで合成オリゴヌクレオチドプローブでスクリーニングし、IFN- β 2/IL-6受容体またはその可溶性フラグメントをコードする配列を同定することができる。

別法として、受容体を発現する細胞から

mRNAを単離し、精製後上述のようにしてcDNAに変換する。cDNAを公知方法によつて二本鎖cDNAに変換し、クローニ化し、得られたクローニについて適当なプローブを用い所望の配列をコードするcDNAをスクリーニングする。所望のクローニが単離されたならば、cDNAをゲノムDNAの場合と実質的に同様に操作する。しかしながら、cDNAにはイントロンまたは介在配列は存在しない。

本発明はまた、IFN- β 2/IL-6-Rまたはその可溶性フラグメントをコードするDNAにプローブとして使用される合成オリゴヌクレオチドに関する。これらは、IFN- β 2/IL-6-Rのフラグメントのアミノ酸配列に基づいて、公知方法により合成される。この目的では、完全なIFN- β 2/IL-6-Rまたはその可溶性細胞外フラグメントの配列解析のいずれかを行い、そのペプチドフラグメントを得、そのアミノ酸配列を特性づけする。ペプチドフラグメントは、精製蛋白質プレバレーションを、たとえば本技術分

野でよく知られたトリプシン、キモトリプシンまたはパバインのようなプロテアーゼの消化による断片化に付すことによって得られる (Oike, Y. ら : J. Biol. Chem. 257 : 9751-9758, 1982)。これらはついで逆相HPLCで分離し、自動アミノ酸配列決定法で配列を決定する。

1個または2個以上の適当なペプチドフラグメントの配列が決定されるかまたは蛋白質の部分配列が決定されたならば、これらをコードできるDNA配列を検討する。遺伝子コードの縮重により、特定のアミノ酸をコードするためには2個以上のコドンを使用できるので、IFN- β 2/IL-6-Rペプチドフラグメントをコードできるオリゴヌクレオチドは1個または2個以上作成できる (Walton, J. D. : Molecular Biology of the Gene, 第3版、W.A. Benjamin, Inc. Menlo Park, CA (1977)、356~357頁)。しかしながら、このセット中のひとつのみが、遺伝子のヌクレオチド配列と同一のヌクレオチド配列を含有する。セット中にそれが存在し、それがセ

ットの他のメンバーの存在下でもDNAにハイブリダイズできる能力があれば、このオリゴヌクレオチドのセットを分画しないまま、ペプチドをコードする遺伝子をクローニングするために単一のオリゴヌクレオチドを使用しているのと全く同様に使用することが可能である。IFN- β 2/IL-6-R遺伝子フラグメントをコードできる理論的に「最も高い可能性」をもつオリゴヌクレオチドまたはそれを含有するオリゴヌクレオチドのセットを用いることにより (Lath, R. ら (1985) J. Molec. Biol. 183 : 1~12に開示されている「コドン使用規則」に従って)、IFN- β 2/IL-6-Rもしくは少なくともその部分をコードする「最も高い可能性」をもつ配列またはその配列のセットにハイブリダイズできる相補的オリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドのセットの配列を同定することができる。このような相補性配列を含むこのオリゴヌクレオチドを次に合成し、本発明のIFN- β 2/IL-6-RをコードするDNA分子をDNAライブラリーから

同定し単離するためのプローブとして使用する (Maniatis, T. ら : Molecular Cloning : A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, 1982)。

本発明の一態様においては、IFN- β 2/IL-6受容体の遺伝子の単離は、緊縮条件下でのコロニーハイブリダイゼーション法によって行われる。核酸のハイブリダイゼーション操作は公知であり、たとえば Maniatis, T. : Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 前出、および Haymes, B. T. ら : Nucleic Acid Hybridization: A Practical Approach, IRL Press, Oxford, England (1985) に開示されている。上述のヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドプローブのセットとのハイブリダイゼーションにより、cDNAまたはゲノムライブラリー中にこのようなハイブリダイゼーションが可能なDNA配列を同定することができ、ついでこれらを解析して、これらがIFN- β 2/IL-6-Rをコードする配列をどの程度含んでいるかを決定する。本発

明の受容体可溶性細胞外フラグメントをコードするDNAはついで、全受容体の陽性クローンのDNAから公知操作によって得られ、本技術分野でよく知られている技術により、適当に構築された発現ベクター中に挿入される (Maniatisら : 前出参照)。二本鎖cDNAは、ホモポリマーテーリング法により、または合成DNAリンカーの使用もしくはプラント末端連結法を用いる制限結合法により、プラスミドベクターに連結される。DNA分子の連結にはDNAリガーゼが用いられ、望ましくない結合はアリカリホスファターゼ処理によって回避する。

所望の蛋白質の発現に際しては、発現ベクターは遺伝子の発現と蛋白の産生を可能にするために、目的の蛋白をコードするDNAに結合した、転写および翻訳制御情報を含む特異的なヌクレオチド配列を含有していなければならない。まず第一に遺伝子が転写されるために、ポリメラーゼが結合しており従って転写過程を開始させる、RNAポリメラーゼに認識されるプロモーターが先行して

いなければならない。このようなプロモーターは種々のものが使用されており、これらは異なる効率（強いプロモーターと弱いプロモーター）で機能し、原核生物と真核生物で異なる。シャイン-ダルガルノ (Shine-Dalgarno) 配列 (SD配列) のようなリボソーム結合部位を使用することにより、原核生物において高レベルの遺伝子発現を達成することができる。真核生物宿主細胞では、宿主細胞の性質により、異なる転写及び翻訳制御配列を使用することができる。これらはウイルス（例えばアデノウイルス、ウシバビローマウイルス、シミアンウイルス (Simian virus) など）由来のこともあり、調節シグナルは、高レベルの発現を有する特定の遺伝子に関連している。その例としてはヘルペスウイルスのTKプロモーター、SV40アーリープロモーター、酵母のg a 1 4 遺伝子プロモーターなどがある。遺伝子の発現が調節できるように、抑制と活性化ができる転写開始調節シグナルを選択することもできる。

シグナルペプチドと機能的に結合している転写

否かということである。

作成物 (construct<s>) を含有するベクター又はDNA配列が発現用に調製されたら、DNA作成物を任意の方法で適当な宿主細胞中に導入することができる：形質転換、トランスフェクション (transfection)、結合 (conjugation)、原形質融合、エレクトロポレーション (electroporation)、リン酸カルシウム沈殿、直接マイクロインジェクション (direct microinjection) など。本発明で使用する宿主細胞は、原核生物でも真核生物でもよい。好適な原核生物宿主細胞としては、大腸菌、バシリス、放線菌、シュードモナス、サルモネラ菌、セラチア菌などがある。最も好適な原核生物宿主細胞は大腸菌である。このような条件では、蛋白はグリコシル化されない。原核生物宿主細胞は発現プラスミッド中のレブリコンや調節配列に対して融和性がなければならない。蛋白分子に対する翻訳後の改変（正しい折り畳み (folding) と正しい部位でのグリコシル化）を可能にするため、哺乳動物細胞（たとえばヒト、サル、マウス、チ

及び翻訳調節シグナルのヌクレオチド配列が先行する、本発明のIFN- β 2/IL-6-R可溶性細胞外フラグメントのアミノ酸配列を含む蛋白をコードするヌクレオチド配列よりなるDNA分子を、目的の遺伝子配列を宿主細胞染色体に取り込むことができるベクター中に挿入する。発現ベクターを含有する宿主細胞の選択を可能にする1つ又はそれ以上のマーカーを導入することによつても、染色体中にDNAを安定的に取り込んだ細胞を選択することができる。

好適な態様において、導入されたDNA配列は、受容宿主細胞中で自己複製可能なプラスミッド又はウイルスベクターの中に取り込まれる。原核生物および真核生物プラスミッドは文献中で公知である。特定のプラスミッドやウイルスベクターの選択に重要な因子は、ベクターを含まない受容細胞からベクターを含む受容細胞を認識し選択することの容易性；特定の宿主細胞中での目的のベクターのコピー数；そして異なる種間でベクターを「シャトル」（行き来）させることができが好ましいか

ーズハムスター卵巣細胞 (CHO) は、好適な真核生物宿主細胞である。酵母細胞もグリコシル化などの翻訳後の改変が可能である。

ベクターの導入後宿主細胞を選択培地で増殖させて、ベクター含有細胞の増殖を選択する。クローン化遺伝子配列の発現により、所望のIFN- β 2/IL-6-Rフラグメントが产生される。次に本明細書に記載の精製法又は他の従来法（例えば抽出、沈殿、クロマトグラフィー、電気泳動など）により、発現蛋白を単離し精製する。

本発明の蛋白に優先的に使用される精製法は、產生後カラム内に含まれるゲルマトリックスに固定化された抗-IFN- β 2/IL-6-Rモノクローナル抗体を使用するアフィニティクロマトグラフィーである。組み換え蛋白を含む不純物調製物をこのカラムに通す。特異的抗体により蛋白はカラムに結合し、不純物は通過していく。洗浄後pH又はイオン強度を変えてゲルから蛋白を溶出する。

本明細書における「塩」という語は、当業者に

公知の手段で形成された蛋白分子のカルボキシル基の塩及びアミノ基の酸付加塩を意味する。カルボキシル基の塩としては、無機塩（例えばナトリウム、カルシウム）、及び有機塩（例えばトリエタノールアミン、アルギニン、リジン）との塩がある。酸付加塩としては例えば無機酸との塩や有機酸との塩がある。

本明細書における「官能性誘導体」とは、当業者に公知の方法で、残基の側鎖又はN末端又はC末端上に存在する官能基から調製される誘導体を意味し、薬剤として許容される限り（即ち蛋白の活性を破壊せず、これを含有する組成物に毒性を与えない限り）本発明に含まれる。これらの誘導体としては、カルボキシル基の脂肪族エステル又はアミド、及びアシル分子（例えばアルカノイル基又はカルボサイクリックアロイル基）と形成される遊離アミノ基のN-アシル誘導体、又は遊離ヒドロキシ基のO-アシル誘導体がある。

「前駆体」とは、動物またはヒト体内において、IFN- β 2/IL-6-Rの前に形成され、そ

抗体でもよう。またそれらはウサギ、マウス、又は他の動物、又はそれらに由来する培養組織細胞、又はヒトの細胞由来の産生物でもよい。これらは天然の抗体と同じ形か又はキメラ分子（ヒトの抗体と動物の抗体の組換えにより作成される）の形、又は抗体を治療に最も適した形にし

抗体の発生レベルは、IFN- β 2/IL-6のハイブリドーマ成長因子（HGF）活性の、動物血清による阻害能で追跡する。

抗体の調製には、精製IFN- β 2/IL-6受容体もしくはその可溶性細胞外フラグメントまたは蛋白質の既知の配列たとえばN-末端蛋白質配列と同一の1種もしくは2種以上の合成ペプチドを使用して動物を免疫する。他の可能性としては受容体のフラグメントをコードするヌクレオチド配列の1種をプロテインAをコードする遺伝子に融合し、融合プロテインA-IFN- β 2/IL-6-R遺伝子を大腸菌内で発現させ、融合蛋白質をIgG Sepharoseカラム上アフィニティーカロマトグラフィーで精製し、ついでこれを用

れに変換される化合物である。実質的に精製された蛋白質の「活性分画」として、本発明は、蛋白質分子のポリペプチド鎖の任意のフラグメントまたはその前駆体の単独、ならびにその分画が細胞に対するTNFの細胞毒作用の阻害能および/または長期にその有益な作用を維持する能力がある限り、それらと会合した分子または結合した残基、たとえば糖もしくはリン酸残基を伴う蛋白質、または蛋白質分子または糖残基の凝集体自体も包含する。

本発明はさらに、IFN- β 2/IL-6-Rおよびその可溶性細胞外フラグメントに対する抗体、ならびにそのF(ab)フラグメントに関する。本発明の抗体とIFN- β 2/IL-6-Rとの機能的相互作用は、ある種の疾患において生体内での細胞によるIFN- β 2/IL-6-Rの產生過剰または過少を免疫検定法たとえば放射免疫検定法、ELISA等に基づいて検出する新しい診断手段を提供する。

抗体はポリクローナル抗体でもモノクローナル

いて動物を免疫する方法がある。

本発明のモノクローナル抗体は従来のハイブリドーマ技術により調製される（コーラー（Kohler）ら、ネーチャー（Nature）、第256巻、495頁（1975年）、コーラー（Kohler）ら、ヨーロピアンジャーナルオブイミュノロジー（Eur. J. Immunol.）、第6巻、511頁、（1976年））。免疫後脾臓細胞を単離で又は免疫動物のリンパ節細胞と共に単離し、適当なミエロマー細胞株と融合させる。融合後得られたハイブリドーマ細胞をHAT培地で選択的に維持した後クローニ化する。次にこの選択により得られたハイブリドーマを検定して、IFN- β 2/IL-6受容体またはその可溶性細胞外フラグメントに結合可能な抗体を分泌するクローンを同定する。同定後、所望のクローンを懸濁培養液中で、または適当な宿主マウスの腹膜に注射して腹水中で、大量に増殖させる。ついで、ハイブリドーマによって產生されるモノクローナル抗体を単離し、精製する。

前述したように、モノクローナル抗体は固定化し、免疫吸着カラムを使用するアフィニティー精製操作での IFN- β 2 / IL-6 受容体またはその可溶性細胞外フラグメントの精製に使用することもできる。

IFN- β 2 / IL-6-R およびその可溶性細胞外フラグメント、ならびにそれらの塩、官能性誘導体、前駆体および活性分画、およびこれらの任意の混合物は、哺乳動物における IFN- β 2 / IL-6 の望ましい作用たとえば IFN- β 2 / IL-6 の抗増殖活性の刺激および増強に使用できる。

本発明はさらに、医薬的に許容される担体、と、IFN- β 2 / IL-6 ならびに IFN- β 2 / IL-6-R、その可溶性細胞外フラグメント、またはそれらの塩、官能性誘導体、前駆体もしくは活性分画およびこれらの任意の混合物を活性成分として含有する医薬組成物に関する。これらの組成物は、IL-6 の活性の刺激を所望の場合に使用できる。もちろん、IFN- β 2 / IL-6

の投与量は、受容体の増強作用という点から低いものである。投与方法は類似の薬剤について一般に受け入れられている任意の方法が使用でき、処置すべき状態によって決定される。

本発明の医薬組成物は、活性成分を生理的に許容される担体、安定剤および賦形剤と混合して投与用に調製され、適当な剤形たとえばバイアル中に加えた凍結乾燥物とすることができる。活性化合物の投与量は、投与経路、処置する疾患および患者の状態によって変動する。

IFN- β 2 / IL-6-R およびその可溶性細胞外フラグメントならびにそれらの塩、官能性誘導体、前駆体および活性分画、およびこれらの任意の混合物はまた、単独で、細菌感染、火傷、外傷などのような状態に際して内因性に生成される IFN- β 2 / IL-6 の活性を増強するため使用できる。

次に本発明を以下の実施例によって例示するが、これは本発明を限定するものではない。

例 1

IFN- β 2 / IL-6 受容体のヒト胎盤からの単離および精製

胎盤膜は R. A. Hock & W. D. Hollenberg の方法 (J. biol. Chem., 255, 10731~10736, 1980) に従い以下のようにして調製する。胎盤片を 25 mM Tris-HCl、pH 7.4、0.25 M スクロース、0.1 M NaCl、1.5 mM MgCl₂、2 mM EGTA、1 mM PMSF および 22 Ti u/ml アプロチニンからなる緩衝液中でホモジナイズし、ついでガーゼを通して滤過し、遠心分離する (10,000 × g、30 分、4 °C)。上澄液に NaCl と MgSO₄ を加え、終濃度をそれぞれ 0.1 M および 0.2 mM とする。混合物を遠心分離し (48,000 × g、40 分、4 °C)、得られたペレットを 10 mM Hepes、pH 7.4、150 mM NaCl、1 mM PMSF および 22 Ti u/ml の緩衝液中に再懸濁する。ついで、膜を可溶化緩衝液 (終濃度: 10 mM Hepes、pH 7.4、1~2% Triton X-100、1 mM

PMSF および 20 単位/ml アプロチニン) 中に溶解する。この懸濁液を最初 10,000 × g で 15 分間、ついで 100,000 × g で 60 分間遠心分離する。上澄液を固定化 IFN- β 2 / IL-6 カラムに適用する (0.8 ml の Affigel-10 あたり 2.5 mg)。負荷は流速 0.2~0.5 ml/分で行う。次にカラムを PBS (50 ml) で洗浄し、結合した物質を 25 mM クエン酸溶液で溶出する。1 ml ずつの分画を集め、直ちに 1 M Hepes、pH 8.5 で中和する。各分画について、その ¹²⁵I-IFN- β 2 / IL-6 結合能と蛋白質含量を調べる。蛋白質はプロレスカミンで定量する。

例 2

IFN- β 2 / IL-6-R 可溶性細胞外フラグメントの単離および精製

2. 1 尿濃縮液の調製

健康な更年期の婦人からの尿 200 l のプールを、孔径 0.45 μm の Pellicon 膜上、精密滤過に付した。滤液を、分子量カットオフ 10 K の

Pellicon膜を用い、最終容量500mlに限外濾過した。この濃縮液を、1 mMベンズアミジンおよび0.1%ナトリウムアジドを含むリン酸緩衝食塩溶液に対して透析した。

2. 2. CM-Sephadose 上イオン交換クロマトグラフィー

CM-Sephadose (Pharmacia, Uppsala, Sweden) 陽イオン交換カラム (2.7 × 10 cm) を 0.02% NaNO₃ 含有 1 M NaCl、10 mM クエン酸 pH 5.0 (緩衝液 C) で前洗浄し、0.02% NaNO₃ 含有 10 mM クエン酸 pH 5.0 (緩衝液 A) で平衡化した。尿蛋白質の濃縮液を緩衝液に対して透析し、8,000 × g で 15 分間遠心分離した。上澄液を 4°C において、流速 2 ml/分でカラムに適用した。カラムを 1,500 ml の緩衝液 A で洗浄し、200 mM NaCl、10 mM クエン酸 (pH 5.0) および 0.02% NaNO₃ を含む溶液 (緩衝液 B) 250 ml で溶出した。溶出の第二工程は 150 ml の緩衝液 C で実施した。50 ml の分画を集め、IFN

-β2/IL-6 結合能 (¹²⁵I-IFN-β2/IL-6 の結合) について試験し、蛋白質濃度を測定した。

2. 3. IFN-β2/IL-6 カラム上アフィニティー精製

IFN-β2/IL-6 を濃度 5 mg/ml とし、ついで 0.002% ナトリウムアジド含有 PBS で平衡化して Affigel-10 にカップリングさせた (0.8 ml のビーズに 2.5 mg)。工程 2.1 または 2.2 の尿蛋白質の濃縮液をリン酸緩衝食塩溶液 (PBS) で平衡化し、4°C において流速 0.2 ml/分で IFN-β2/IL-6 Affigel-10 カラム (0.8 ml の Affigel-10 に 2.5 mg の蛋白質が結合) に適用した。非結合蛋白質を PBS で洗浄し、結合蛋白質をついで pH 2.5 で 25 mM クエン酸溶液を適用することにより溶出し、1 ml ずつの分画を、1 M Hepes、pH 8.5 を含む試験管に集めた。溶出した蛋白質は、電気プロッティングによって蛋白質と ¹²⁵I-IFN-β2/IL-6 の結合についてモニタ

リングした。

2. 4. 逆相高圧液体クロマトグラフィー

逆相 HPLC カラム Aquapore RP-300 4.6 × 30 mm (Brownlee Labs) を、フロレスカミン検出系によって安定な基線が得られるまで、0.3% トリフルオロ酢酸 (TFA) 水溶液 (緩衝液 F) で前洗浄した。工程 2.3 のアフィニティー-IFN-β2/IL-6 カラムから溶出された蛋白質をピーク分画を集め、カラムにその 1.8 ml を注入した。カラムに緩衝液 F を蛍光計が蛋白質を検知しなくなるまで、流速 0.5 ml/分で流した。溶出は、緩衝液 F 中アセトニトリルの直線勾配で (---、5 分間 0~20%、ついで 60 分間 20~50%、最後に 5 分間 50~80%)、流速 0.5 ml/分において実施した。次にカラムを 80% アセトニトリルで 15 分間洗浄した。各 0.5 ml の分画を集め、蛋白質含量 (—) および電気プロッティングによる

¹²⁵I-IFN-β2/IL-6 の結合を試験した。第 1 図に示すように、活性蛋白質はアセトニ

トリル約 39% に相当する分画に 1 個の蛋白質ピークとして溶出されることが明らかにされた。

2. 5. SDS-PAGE および ¹²⁵I-IFN-β2/IL-6 への結合

精製の結果をモニタリングするため、Laemmli U.K. らの方法 (Nature 227: 680, 1970) の方法に従い、非還元条件下にドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) を実施した。逆相 HPLC から溶出する活性分画のサンプルを、SDS も β-メルカプトエタノールも含まない 3 × 濃縮サンプル緩衝液と混合し、12% アクリルアミドゲル上に負荷した。第 2 図においては、分子量指標として分子量マーカー混合物 (α-ラクトアルブミン 4.4 K、大豆トリプシンインヒビター 20.1 K、炭酸デヒドロターゼ 30 K、オバルブミン 43 K、ウシ血清アルブミン 67 K、およびホスホリラーゼ b 94 K) をレーン 1 に負荷した。ゲルは 150 ボルトで流し、蛋白質バンドは銀染色 (Oakley, B.R. ら : Anal. Biochem. 1

0.5 : 3.61) で可視化した。レーン2には、HPLC精製IFN- β 2/IL-6結合蛋白質が、見掛けの分子量50(40~60)Kで単一のバンドとして移動することが認められる。

^{125}I -IFN- β 2/IL-6(2.2× $10^7\text{ cpm}/\mu\text{l}$ 、 $1.5 \times 10^4\text{ cpm}/\text{ml}$)の結合は非還元条件下SDS-PAGEにより行い、ニトロセルロース膜(Schleicher & Schuell, 0.45μm)上への電気プロッティングはウェスタンプロット法(Towbin, H.ら: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76: 4350~4354, 1979)にほぼ従って実施した。レーン3にみられるように、IFN- β 2/IL-6アフィニティーカラム溶出液からの部分精製蛋白質の50(40~60)K蛋白質のみが ^{125}I -IFN- β 2/IL-6と特異的に反応した。IFN- γ アフィニティーカラム溶出液からの精製IFN- γ 結合蛋白質を陰性対照として用いた(レーン4)。レーン3および4はオートラジオグラフィーによって可視化した。

Leu-Ala-Pro-Arg-Arg-Cys-Pro-Ala-Glu-Glu-Val-Ala-Arg-Gly-Val-Leu-Thr-Ser-Lys-Pro-Gly-Asp-Ser-Val-Thr-Leu-Thr-Cys-Pro-Gly-

例3

IFN- β 2/IL-6-Rに対するポリクローナル抗体の製造

IFN- β 2/IL-6-R可溶性細胞外フラグメントの純粋なブレバレーション $10\mu\text{g}$ を完全フロイントアジュバント中に乳化してウサギの皮下に初期投与した。3週後再びブレバレーション $10\mu\text{g}$ を、不完全フロイントアジュバント中、皮下注射した。さらにPBS中溶液として3回の注射を10日間隔で行った。最後の免疫処置後10日目にウサギから採血した。IFN- β 2/IL-6のHGF(ハイブリドーマ成長因子)活性のウサギ血清による阻害能を用いて、発生した抗レベルを追跡した。ウサギ血清の免疫グロブリンを硫酸アンモニウムの添加によって沈殿させ、遠心分離し、透析およびクロマトグラフィーによって精製した。

2. 6. N-末端配列解析

本発明の実質的に精製されたIFN- β 2/IL-6-R可溶性細胞外フラグメントのサンプル(各1~5μg、50~200pmol)を、前処置したbiobreneコートガラス繊維ディスクに適用した。乾燥ディスクを、自動パルス液相蛋白質微量シクエンサー(475型)とオンラインHPLC PTH-アミノ酸分析計(120型)、データ取得および処理ユニット900型(すべてApplied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA)を用いてEdman分解の反復サイクルに付した。コンピューターで得られた配列を生データと比較し、必要に応じて補正を行った。配列データの確認のために、すべて2回の分析を別個に実施した。初期収率は40%以上で、ブレバレーション中の主要蛋白質(50Kバンド)が得られた配列に適合することを示している。このIFN- β 2/IL-6-Rの可溶性細胞外フラグメントのN-末端配列決定では以下のアミノ酸配列が得られた。

例4

IFN- β 2/IL-6-Rに対するモノクローナル抗体の製造

Balb/C雌性マウス(3月齢)に最初、精製IFN- β 2/IL-6-R可溶性細胞外フラグメント $2.5\mu\text{g}$ を完全フロイントアジュバントに乳化して注射し、3週後に不完全アジュバント中で皮下注射した。さらにPBS中での注射を3回、10日間隔で皮下に行った。最終の増強は融合の3日前、倒立固相RIAで最高の結合力値を示すマウスの腹腔内に実施した。融合は、融合パートナーとしてその動物のいずれも脾臓およびリンパ節から調製したリンパ球とNSO/1骨髄腫細胞とを用いて行った。融合細胞は微小培養ブレート中に分配し、HATおよび15%ウマ血清補充DMEM中で選択した。IFN- β 2/IL-6-Rに対する抗体を產生することが明らかにされたハイブリドーマを限界希釈法でサブクローニングし、予め腹水の產生のためプリスタンで感作したBalb/Cマウスに注射した。免疫グロブ

リンを腹水から硫酸アンモニウム（50%飽和）で沈殿させ、遠心分離し、水に再溶解し、0.02%アジド含有PBSに対して透析して単離した。抗体のアイソタイプは市販のELISAキット(Amersham, U.K.)を用いるか、または異なるアイソタイプに対する市販の抗血清を用いるOuchterlony法で同定した。

抗-IFN- β 2/IL-6-Rモノクローナル抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングは以下のようにして実施した。すなわち、ハイブリドーマ上澄液について、倒立固相放射免疫検定法(RIA)により抗-IFN- β 2/IL-6-R抗体の存在を調べた。PVCマイクロタイタープレート(Dynatech Laboratories, Alexandria, VA)をアフィニティー精製ヤギ抗マウス血清F(ab)₂抗体(BioMakor)(1.0 μ g/ml、80 μ l/ウェル)でコーティングした。一夜4°Cでインキュベートしたのち、プレートをBSA(0.5%)およびTween20(0.05%)含有PBSで2回洗浄し、37°Cにおいて少なくとも2時間、洗浄液中でブロックした。ハイブリドーマ培養上澄液(50 μ l/ウェル)を加え、プレートを37°Cで4時間インキュベートした。次にプレートを洗浄溶液で3回洗浄し、¹²⁵I-IFN- β 2/IL-6-R(50 μ l、1.0⁵cpm)を加えて4°Cでさらに16時間インキュベートした。プレートを3回洗浄し、個々のウェルを切り離し、ガンマカウンターで計数した。陰性対照値よりも少なくとも5倍高いカウントを与えたサンプルを陽性とみなした(第1表)。30回の陽性クローンが選択され、さらに検討し特徴を調べるためにサブクローニングした。

例5:

ウエスタンプロッティング

ウエスタンプロッティングは以下のように実施した。すなわち、ヒト尿からの部分精製IFN- β 2/IL-6-R可溶性フラグメントのサンプルを還元条件下にSDS-PAGEで分析し、ニトロセルロースシート(BA85, Schleicher & Schuell)に電気プロットした。電気プロッティング

後、シートを一夜ブロック緩衝液(0.05%Tween20および0.02%ナトリウムアジド含有PBS中5%脱脂ミルク)とインキュベートし、ついで室温で抗-IFN- β 2/IL-6-Rモノクローナル抗体No34-4と2時間インキュベートした。PBS中0.05%Tween20で洗浄後、ニトロセルロースを室温で¹²⁵I-ヤギ抗マウス血清(0.7×1.0⁶cpm/mlブロック緩衝液)と4時間インキュベートした。ついでシートを洗浄し、乾燥し、オートラジオグラフィーに付した。

単離されたクローンおよびサブクローンの一部のアイソタイプ、倒立RIAおよびウエスタンプロッティングにおけるIFN- β 2/IL-6-Rの結合結果を第1表に示す。

第 1 表

IFN- β 2/IL-6受容体に対するモノクローナル抗体を
産生するクローン

クローン番号	i R I Aによるスクリーニング [CPM]	ウエスタンブロッティング		アイソタイプ +M ⁺ - M
		+M ⁺	-M	
4. 4	20, 455	+	+	IgG ₁
5	1, 085	+	+	IgM
17. 1	36, 565	+	+	IgG ₂
20. 2	31, 450	+	+	IgG ₁
22	11, 465	+	+	IgG ₂
24. 2	8, 850	+	+	IgG ₁
25	2, 000	+	+	IgG ₂
28. 7	1, 645	+	+	IgG ₁
29	4, 165	+	+	IgM
30. 8	1, 755	+	+	IgM
31	3, 060	+	+	IgG ₁
32. 5	31, 465	+	+	IgG ₁
33. 2	14, 875	+	+	IgG ₁
34. 4	33, 480	+	+	IgG ₁
35. 2	35, 495	+	+	IgG ₂
36.	1, 445	+	+	IgM
37	9, 640	+	+	IgG ₁
38. 4	35, 975	+	+	IgG ₁
39. 1	5, 195	+	+	IgG ₂
40	1, 415	+	+	IgG ₁
41	1, 870	+	+	IgG ₁
42. 5	33, 565	+	+	IgG ₁
43	1, 255	+	+	IgG ₁
46	6, 090	+	+	IgG ₁
48	18, 000	+	+	IgM
49	8, 000	+	+	IgG ₁
50. 3	28, 440	+	+	IgG ₁
51	1, 075	+	+	IgM
52	3, 945	+	+	IgM
53. 4	3, 440	+	+	IgG ₁

*M : メルカプトエタノール(還元剤)

例 6

IFN- β 2/IL-6-R可溶性フラグメントのモノクローナル抗体でのアフィニティークロマトグラフィー

IFN- β 2/IL-6-Rに対する抗体を使用して、可溶性フラグメントをアフィニティークロマトグラフィーで精製した。モノクローナル抗体Na 34-4は、倒立固相放射免疫検定法

(i R I A) で放射標識抗原に対するその結合能をテストしたのち、本例のアフィニティークロマトグラフィーに使用した。ハイブリドーマNa 34-4によって分泌されるモノクローナル抗体を含む腹水を、50%飽和硫酸アンモニウムで沈殿させたのち、P B S に対して徹底的に透析して精製した。Wilcheck & Miron: Methods in

Enzymology 34: 72~79, 1979に特定されているように、免疫グロブリン約10mgがポリアクリルヒドラジドアガロース1mlに結合した。

カルボキシメチルセファロース(C M S)カラムで部分精製したヒト尿250ml(粗製の尿250

mlに相当)を抗-IFN- β 2/IL-6-R抗体カラム0.5mlに4°C、流速0.25ml/分で負荷した。カラムを、洗液に蛋白質が検出されなくなるまでP B Sで洗浄した。IFN- β 2/IL-6-R可溶性フラグメントは25mMクエン酸緩衝液、pH 2.2で溶出し(8×1カラム容量分画)、直ちに1M Hepes緩衝液、pH 8.5で中和し、計88%のIFN- β 2/IL-6-R可溶性フラグメントが回収された。溶出分画のSDS-PAGEの銀染色解析により、M. W. 50,000の主要バンドと他の主要バンド150,000(夾雑物)が認められた。このプレバレーションをさらにR P - 300 HPLCで精製し、可溶性受容体フラグメントは第1図と類似のパターンで39%アセトニトリルで溶出した。

第二章

尿からのIL-6受容体の免疫アフィニティ精製(CMS)

McAb カラム	サンプル	ELISA		純度 %	収率 %
		ELISA Ml/ml	ELISA Ml/ml		
34.4	食尚 流出液	250 2200	550,000 500,000	0.38 0.06	95 15
	溶出液1 溶出液2 溶出液3 溶出液4	1.2 1.2 1.2 1.2	20 45 18 11	24 54 21.6 13	7.7 30.4 12 6
	全溶出液				67 80 9.6 87 69.5 88

洗浄し、ABTS (2, 2'-アジノーブス (3-エチルベンズチアゾリン-6-スルホン酸), Sigma) 基質により発色させた。プレートを自動ELISAリーダーで読み取った。別法として、ELISAは、ウサギポリクローナル抗-IFN- β 2/IL-6-R抗体をモノクローナル抗体Na22-1のHRP接合体またはビオチン化体で置換して実施することも可能であった。

例8

IFN- β 2/IL-6-R可溶性細胞外フラグメントの活性をIFN- β 2/IL-6のハイブリドーマ/形質細胞腫成長因子(HGF)活性について試験した。マウス形質細胞腫T1165細胞を、大腸菌内で產生させ、均一に精製した(2×10^4 HGF単位/mg) 純粋なヒト組換えIFN- β 2/IL-6の低濃度に16時間暴露した。平行して、同じIFN- β 2/IL-6サンプルを、様々な濃度のIFN- β 2/IL-6-R可溶性細胞外フラグメントと37℃で90分間インキュベートし、ついで細胞に加えた。0.

例7:

ELISA試験

マイクロタイタープレート(Dynatech または Maxisorb, Nunc)を、抗-IFN- β 2/IL-6-Rモノクローナル抗体No34-4(免疫グロブリン分画、120μl, 20μl/ml PBS)により4℃で一夜コーティングした。プレートをBSA(0.5%)およびTween20(0.05%)含有PBSで洗浄し、同じ溶液を用いて37℃で少なくとも2時間ブロックした。試験サンプルはブロック溶液で希釈し、ウエルに加え(100μl/ウエル)、37℃に4時間放置した。ついでプレートをTween20(0.05%)含有PBSで3回洗浄し、ついでウサギ抗-IFN- β 2/IL-6-R血清(1:1000, 100μl/ウエル)を加え、さらに37℃で4時間インキュベートした。プレートを3回洗浄し、ヤギ-抗-ウサギ西洋ワサビペルオキシダーゼ接合体(HRP, Biomatik, 1:2000, 100μl/ウエル)を加え、37℃に2時間放置した。プレートを4回

25ng/mlのIFN- β 2/IL-6単独ではパルスT1165細胞への³Hチミジンの取り込みは刺激されなかったが、IFN- β 2/IL-6-R可溶性細胞外フラグメントの添加により用量依存性の刺激を生じた(第Ⅲ表)。5ng/mlのIFN- β 2/IL-6ではT1165細胞の成長刺激がみられ、IFN- β 2/IL-6-R可溶性細胞外フラグメントによりわずかな刺激のみが認められた。対照としてのヒト尿から精製したINF- γ 可溶性受容体は作用を示さなかった。すなわち、閾値濃度以下のIFN- β 2/IL-6がIFN- β 2/IL-6-R可溶性細胞外フラグメントの添加によって特異的に増強できる。細胞上に約5,000個のIFN- β 2/IL-6受容体を仮定すると: IFN- β 2/IL-6の0.25ng/mlは受容体あたり約150分子のサイトカインに相当する。IFN- β 2/IL-6-R可溶性細胞外フラグメントの刺激作用は、マウスIFN- β 2/IL-6受容体あたり5~10,000のIFN- β 2/

IL-6-R可溶性細胞外フラグメント分子を添加すると、みられ始める。IFN- β 2/IL-6-R可溶性細胞外フラグメントの部分は不活性であっても、作用は化学量論的であるように思われる。

Epstein-Barrウイルス(EBV)でトランスポームされたヒトB細胞のいくつかの系統は、

IFN- β 2/IL-6によって成長刺激を受ける。T1細胞系では、IFN- β 2/IL-6-R可溶性細胞外フラグメントは、マウスT1165形質細胞腫細胞にみられたようなIFN- β 2/IL-6の作用の増強を示さなかった。実際、T1細胞では、IFN- β 2/IL-6-R可溶性細胞外フラグメントはIFN- β 2/IL-6作用の阻害剤として、このサイトカインの低濃度において挙動した。

HGF活性の検定では、IFN- β 2/IL-6の生物活性は、マウス形質細胞腫T1165細胞での 3 H-チミジンの取り込みによって測定される(Nordan, R. P. & Potter, M. Science (198

6) 233: 566-568)。簡単に説明すれば試験サンプルの希釈系列(60%)をT1165細胞(40%中 10^4 個)と96-ウエルマイクロタイタープレート中37°Cで一夜インキュベートした。 3 H-チミジン(1 μ Ci/ウエル)のパルスを37°Cで4時間与えた。細胞を自動ハーベスターで収穫し、計数した。1単位のIFN- β 2/IL-6は検定において最大効果の50%を与える蛋白量と定義した。

第三表

マウス形質細胞腫T1165細胞の成長の刺激

IFN- β 2/ IL-6 ng/ml	IFN- β 2/IL-6-R 可溶性細胞外 フラグメント	3 H-チミジン取り込み カウント/分
0. 25	なし	5, 800
"	なし	5, 780
"	0. 03	7, 750
"	0. 06	9, 100
"	0. 12	10, 100
"	0. 25	20, 000
"	0. 50	29, 750
"	1. 00	40, 400
2. 5	なし	16, 000
2. 5	0. 25	16, 000
5. 0	なし	32, 000
5. 0	0. 25	48, 000
0. 25	IFN- β 2/R可溶性フラグメント	6, 350

第四表

ヒトEBV-トランスポームB細胞系T1の刺激

IFN- β 2/IL-6 ng/ml	3 H-チミジン取り込み カウント/ 10^2	
	単独	+ IFN- β 2/IL-6-R 可溶性細胞外 フラグメント
なし		
0. 05	20	25
0. 2	33	25
12. 5	39	29
25. 0	39	40
	42	39

IFN- β 2/IL-6-R可溶性細胞外フラグメント濃度は0. 6ng/mlであった。

例9:ヒト乳癌細胞に対する活性

ヒト乳房管癌細胞T47DはIFN- β 2/IL-6で増殖を阻止される。これらの細胞はIFN- β 2/IL-6受容体結合部位に富み、少なくともリンパ球および骨髓腫細胞の場合に匹敵する。T47D癌細胞培養の一連のサブクローンを単離し、そのIFN- β 2/IL-6による増殖阻害を比較した。数種の試験で、まばらに接種した細胞からのコロニー形成および半集密的単層における³H-チミジンの取り込みは、一部のクローン（たとえば07）では、母体のT47D培養体に比べて感受性が高く、他のクローン（たとえば012）では感受性が低かった。IFN- β 2/IL-6-R可溶性細胞外フラグメントの作用は、IFN- β 2/IL-6が用量依存性の阻害を生じる³H-チミジン取り込み試験で調べた（第V表）。

IFN- β 2/IL-6-R可溶性細胞外フラグメント単独では全く作用を示さなかったが、可

溶性受容体はIFN- β 2/IL-6の抗成長作用を強力に増強した。ネズミ形質細胞腫にみたれたのと異なり、IFN- β 2/IL-6-R可溶性細胞外フラグメントのヒト乳癌細胞に対する作用は、IFN- β 2/IL-6の高濃度で著しかった。50%阻害に必要なIFN- β 2/IL-6の量の低下のみならず、作用の振幅は著しく増強された。IFN- β 2/IL-6-R可溶性細胞外フラグメントの存在下、³H-チミジン取り込みの阻害は98%に達し、一方、IFN- β 2/IL-6-R可溶性細胞外フラグメントの不存在下には、残留DNA合成はIFN- β 2/IL-6の高用量でも観察された。この結果は、IFN- β 2/IL-6-R可溶性細胞外フラグメントが、012のような抵抗性の強いサブクローンにもIFN- β 2/IL-6の増殖阻害に完全に反応させることを示唆している。実際、IFN- β 2/IL-6-R可溶性細胞外フラグメントの添加により012細胞の³H-チミジン取り込みはほぼ完全に阻害され（第3図）、この作用はこ

の場合もIFN- β 2/IL-6の高濃度において明瞭であった。

これらの結果は、IFN- β 2/IL-6-R可溶性細胞外フラグメントがヒト乳癌細胞に作用し、感受性および反応の振幅の両者を増大させることを示している。

ヒト乳癌T47Dクローン07の増殖阻害

IFN- β 2/IL-6 ng/ml	³ H-チミジン取り込み カウント/分 $\times 10^{-2}$	
	単独	+ IFN- β 2/IL-6-R 可溶性細胞外フラグメント
b.r	100 57	103 32
1.5	46	12
7.5	37	4
36	26	2
180	12	4
900		

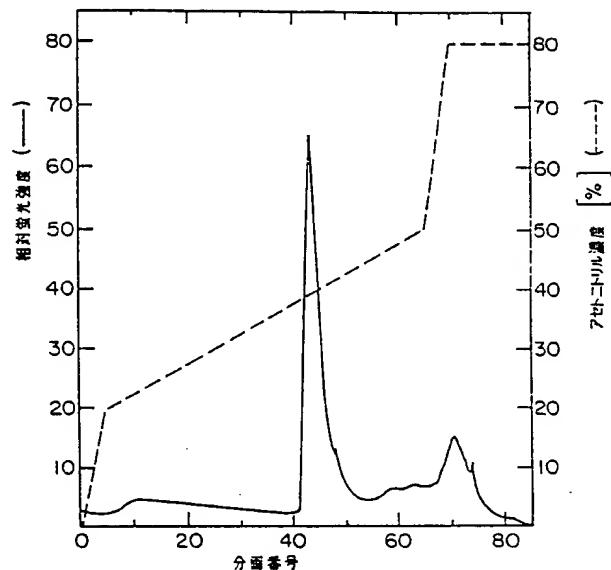
IFN- β 2/IL-6-R可溶性細胞外フラグメントの濃度は0.6μg/ml

4. 図面の簡単な説明

第1図は、IFN- β 2/IL-6-R可溶性細胞外フラグメント分画の固定化IFN- β 2/IL-6カラム上での部分精製後における逆相HPLCカラム溶出パターンを示し、第2図は、IFN- β 2/IL-6可溶性細胞外フラグメントの非還元条件下でのSDS-PAGEの結果を示す写真であり、第3図はヒト乳癌T47D細胞に対するIFN- β 2/IL-6-HGF活性のIFN- β 2/IL-6-R可溶性細胞外フラグメントによる増強効果を示す。

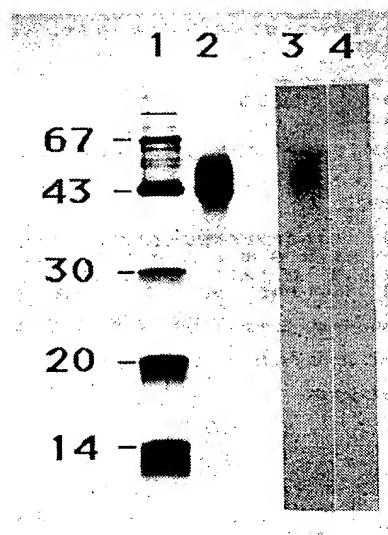
図面の添書(内容に変更なし)

第1図

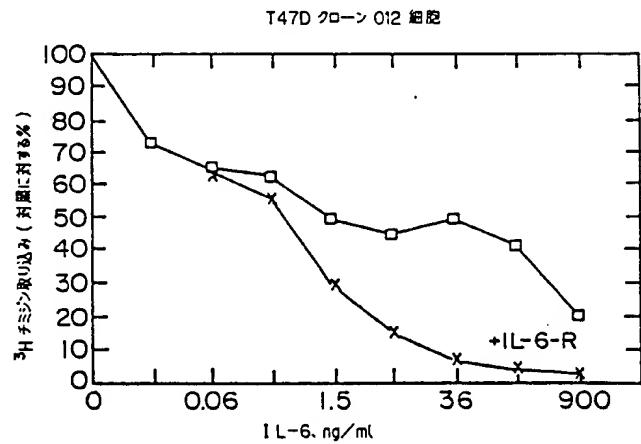


代理人 浅 村 鮎

第2図



第3図



第1頁の続き

⑥Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号
C 07 K 3/22	ZNA	8619-4H
C 12 N 15/12	C	8214-4B
C 12 P 21/00	P	8214-4B
21/08	B	7906-2G
G 01 N 33/53	N	9015-2C
33/577	D	8829-4C
// A 61 K 39/395		8829-4C
C 12 N 5/20		
15/06		
(C 12 P 21/00		
C 12 R 1:91)		
(C 12 P 21/08		
C 12 R 1:91)		
C 07 K 99:00		

優先権主張 ②1989年11月26日 ③イスラエル(I L) ④092444
 ⑦発明者 ハルトムツト エンゲ ドイツ連邦共和国ミュンヘン 70, ヨゼフ・ルツツ・ベグ
 ルマン 35
 ⑦発明者 ミシエル レベル イスラエル国レホボト, ウィズマン インスチチュート
 オブ サイエンス, ベット ブラジル 5
 ⑦発明者 メナケム ルービンス イスラエル国ギバット シュムエル, ハツトマー ストリ
 テイン ート 16
 ⑦発明者 デビッド ワラツク イスラエル国レホボト, ポロチヨフ ストリート 25

手 続 補 正 書 (自発)

平成2年8月23日

特許庁長官殿

1. 事件の表示

平成2年特許願第144235号

2. 発明の名称

ヒトインターフェロン-β2/インター
ロイキン-6受容体

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

名 称 イエダ リサーチ アンド デベロップメント
カンパニー リミテッド

4. 代理 人

居 所 〒100 東京都千代田区大手町二丁目2番1号
新 大 手 町 ビ ル デ ン グ 331
電 話 (211) 3651 (代 表)
氏 名 (6669) 清 村 結

1. 事件の表示

平成 02 年 特許願第 144235 号

2. 発明の名称

ヒトインターフェロン-β2/インター^{ロイキン-6受容体}

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人
氏名(名前)

イエダ リサーチ アンド デベロップメント カンパニー リミテッド

4. 代理 人

居 所 〒100 東京都千代田区大手町二丁目2番1号
新 大 手 町 ビ ル デ ン グ 331
電 話 (211) 3651 (代 表)
氏 名 (6669) 清 村 結

5. 補正命令の日付 平成 2 年 8 月 23 日

6. 補正により増加する請求項の数

7. 補正の対象

図面

5. 補正の対象

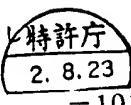
明細書

6. 補正の内容

別紙のとおり

明細書の添付 (内容に変更なし)

方式 (矢)



-1010-

8. 補正の内容 別紙のとおり

明細書に最初に添付した図面の添付 (内容に変更なし)

